荷瘤与切除肿瘤小鼠尿液蛋白质组的比较

衡姊琦[1] 赵晨阳[1] 高友鹤*
[1]（北京师范大学基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100871）

摘要：
[目的] 本研究关注了临床外科医生最关心的问题——实体肿瘤切除效果。尿液蛋白质组能够灵敏的反映机体的生理变化。探索小鼠 MC38 皮下瘤切除与否尿液蛋白质组的变化。
[方法] 建立 MC38 皮下荷瘤小鼠模型，将小鼠分为健康对照组，完全切除实验组和完全不切除实验组。对三组小鼠进行手术，收集手术后第 7 天、第 30 天的尿液，利用液相色谱联用质谱（LC-MS/MS），对尿液蛋白质组进行鉴定，分析差异蛋白和相关生物学通路。
[结果] (1)皮下瘤完全切除组和完全不切除组切除手术后 7 天，尿液蛋白质组可以筛选出能够区分两组的 20 个差异蛋白，生物学过程包括昼夜节律、Notch 信号通路、白细胞间粘附、异嗜性细胞通过质膜粘附细胞分子等。(2) 皮下瘤完全切除组和完全不切除组切除手术后 30 天，尿液蛋白质组可以筛选出能够区分两组的 33 个差异蛋白，生物学过程包括细胞粘附、补体激活和替代途径、免疫系统的过程、血管生成等。(3) 皮下瘤完全切除组和健康对照组切除手术后 30 天两组差异不明显。
[结论] 尿液蛋白质组的变化可以反应肿瘤切除与否。

关键词：肿瘤；手术切除；尿液；蛋白质组

The comparison of urine proteomes from tumor-bearing mice with those from tumor-resected mice

Heng Ziqi[1] Zhao Chenyang[2] Gao Youhe*
1 (Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, Beijing Normal University, Beijing 100871, China)

Abstract:
[Objective] This study focuses on the most important concern of surgeons - whether they resected all the tumors. Urine may reflect early changes associated with physiological or pathophysiological processes. Based on the above ideas, we have conducted some experiments to explore changes in the urine proteome urine proteomes between tumor-bearing mice to tumor-resected mice.
[Method] The tumor-bearing mouse model was established with MC38 mouse colon cancer cell, and the mice were divided into the healthy control group, tumor complete resection group, and the tumor non-resection group. Urine was collected on the 7 days and 30 days after resection. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used to identify the urine proteome and then analyze differential proteins and biological pathways.

基金项目：国家重点研发计划课题（2018YFC0910202）；中央高校基本科研业务费专项资金（2020KJZX002）；北京师范大学（11100704）

作者简介：1.衡姊琦（1997.04—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物
2.赵晨阳（1998.04—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物
通信联系人：高友鹤（1964.06—），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物.E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

[Results] (1) 7 days after the tumor removal surgery between the complete resection group and the non-resection group, there are 20 differential proteins that can distinguish the two groups. The biological process includes circadian rhythm, Notch signaling pathway, leukocyte cell-cell adhesion, heterophilic cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules. (2) 30 days after the tumor removal surgery between the complete resection group and the non-resection group, there are 33 differential proteins that can distinguish the two groups. The biological process includes cell adhesion, complement activation, the alternative pathway, immune system process, angiogenesis. (3) There was no significant difference between the two groups at 30 days after the tumor removal surgery between the complete resection group and the healthy control group.
[Conclusion] The changes of urine proteome can reflect tumor with surgical removal or not.
Keywords: tumor; resection; urine; proteome

1 引言

外科治疗实体肿瘤最常用的方法是手术切除加化疗或放疗的方法，但肿瘤切除后的复发情况也十分常见，针对实体肿瘤是否切除干净是很多外科医生最关心的问题。

人体内的所有细胞都依赖于一个稳定的内环境来生存和发挥作用。血液作为所有组织和器官内部环境的关键提供者，需要保持稳定和平衡，以保护器官免受干扰因素的影响。相反，作为血液的滤液，尿液不需要也不具有稳定的机制。因此，尿液可以将机体排出体外的变化进行富集，且不受稳态机制的调控，因此可反映机体疾病引起的早期变化，是寻找生物标志物良好的生物学来源[1]。

在我们实验室之前的研究中，Walker 256 荷瘤大鼠在生长出可触及肿瘤肿块之前，尿液蛋白质组就表现出显著变化，并且尿液中的这些早期变化也可以在癌症晚期通过差异丰度来识别[2]。大鼠尾静脉注射 Walkers-256 细胞后的第 2 天尿蛋白质组就发生了变化，早于第 4 天出现的肺肿瘤结节的病理变化[3]。Walker 256 细胞植入大鼠胫骨的 3 天后肿瘤组的大鼠尿液中有 25 个蛋白发生显著变化，早于计算机断层扫描（CT）检查中发现明显的病变[4]。利用 Walker-256 细胞注射大鼠肝脏后第 3 天，实验大鼠中有 12 个差异蛋白质发生变化，有 7 个差异蛋白与肝癌显著相关，而且在不同器官中生长的相同肿瘤细胞能反映在差异尿蛋白中[5]。

临床尿液样本影响因素多，而且要收集早期病人的样本耗时长，因此建立结直肠癌的小鼠模型，可以将潜在的干扰因素降到最低，并且能够动态的关注动物的发病时间，在病理或临床表现出现之前在足够早期的时间点获得尿液样本，利于肿瘤切除和是否复发的观察[6]。

本实验利用小鼠构建小鼠结肠腺癌细胞系（MC38）皮下瘤模型，模型建立后进行皮下瘤切除手术，并在手术完成后收集小鼠尿液，利用液相串联质谱进行尿液蛋白质组学分析，实验流程如图 1 所示。本实验旨在探索小鼠 MC38 皮下瘤切除与否尿液蛋白质组的变化。

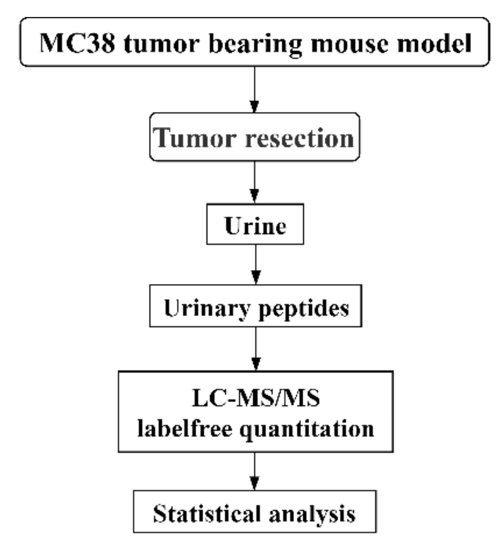


图 1 小鼠皮下瘤切除与否的尿液蛋白质组学表现的研究流程

2 材料与方法

2.1 MC38 皮下瘤小鼠模型的建立

雄性 c57BL/6j 小鼠 18g-20g 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 15 只，动物许可证为 SYXK(京)2021-0074。所有动物在标准环境中（室温 22±1℃，湿度 65%~70%）饲养。将实验小鼠在新环境中饲养三天，使其熟悉环境后，随机分为三组，分别是健康对照组（n=5），皮下瘤完全切除实验组（n=5）和皮下瘤完全不切除实验组（n=5）。MC38 细胞（由北京工业大学盛望教授课题组赠予）加入完全培养基（DMEM 培养液，10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素）,放置于 T75 细胞培养瓶中培养，直至准备好充足的细胞。细胞状态良好时，细胞用台盼蓝染色计数，确保植入动物体内前每管活细胞数大于 90%。将计数好的细胞均调整数量为 5×10^{6} 个/ml。

建模方法如下：小鼠参考体重麻醉，麻醉剂为戊巴比妥钠，剂量为（10mg/kg）。待其麻醉后，固定小鼠四肢于一次性无菌医用垫单上，剔除注射部位毛发后进行消毒。用 1ml 注射器吸取分装好的细胞（对照组注射 PBS 缓冲液），注射体积为 0.1ml，将 MC38 细胞注射于皮下瘤完全切除实验组（n=5）和皮下瘤完全不切除实验组（n=5）小鼠的右后肢皮下。健康对照组（n=5）注射 PBS 缓冲液。根据肿瘤生长状况，对三组小鼠分别给予手术。将皮下瘤完全切除实验组小鼠的皮下瘤完全切除；皮下瘤完全不切除实验组小鼠的皮下瘤保留，只切除部分组织肌肉并保证与完全切除实验组小鼠创面一致；健康对照组只切除部分组织肌肉保证与完全切除实验组小鼠创面一致。

2.2 尿液样本的收集

收集实验小鼠的尿液。在尿液收集期间，所有小鼠单独放置于代谢笼中，并且禁食禁水。过夜收集尿液，收集时间为 12 小时，收集尿液的量不少于 1ml。

2.3 尿液蛋白质的提取和酶解

将小鼠尿液进行蛋白提取，利用胰蛋白酶 (Trypsin Gold，Promega，Fitchburg，WI，USA)，进行酶切后收集肽段；酶切的肽段通过 HLB 柱 (Waters, Milford, MA) 除盐，然后使用真空干燥仪抽干。用 0.1%甲酸水重溶，并稀释到 0.5μg/uL，使用真空干燥仪抽干后用 0.1%甲酸水复溶。再取每个样品制备混合多肽样，使用高 pH 反相肽段分离试剂盒（Thermo Fisher Scientific）进行分级，使用真空干燥仪抽干后用 0.1%甲酸水复溶，用于后续建库。向所有鉴定的样品中加入 iRT（Biognosys）进行保留时间的统一。

2.4 LC-MS/MS 串联质谱分析

2.4.1 数据依赖性采集模式的质谱鉴定数据库采集

使用 EASY-nLC 1200 超高效液相色谱串联 Orbitrap Fusion Lumos 高分辨质谱仪对 10 个分级组分进行数据采集。将溶于 0.1%甲酸水中的肽段装载至预柱（75 μm × 2 cm, 3 μm, C18, 100 A°），将洗脱液装载至反相分析柱（50 μm × 250 mm, 2 μm, C18, 100 A°），洗脱梯度为 4%-35% 流动相 B（80%乙腈+0.1%甲酸+20%水，流速为 300nL/min），90 min。为实现全自动、灵敏的信号处理，在所有样品中使用校准试剂盒（iRT kit , Biognosys, Switzerland），浓度为 1:20 v/v。

以 DDA-MS 模式分析 10 个组分，参数设置如下：喷雾电压 2.4kV，Orbitrap 的一级分辨率为 60000、扫描范围为 350- 1550 m / z，二级扫描范围为 200-2000m/z，分辨率为 30000，筛选窗口为 2 Da，碰撞能量为 30% HCD）。AGC 目标为 5e4，最大进样时间为 30 ms。 raw 文件通过 PD （Proteome Discoverer 2.1，Thermo Fisher Scientific 公司）软件建库和分析，

2.4.2 实验样品的 DIA 数据采集

以 DIA-MS 模式分析 36 个实验样品。液相参数同 DDA 数据库采集。质谱参数设置如下：以 60000 分辨率、350 - 1550 m/z 扫描范围进行一级全扫描；接下来进行二级扫描，分辨率为 30000，建立 36 个筛选窗口，HCD 碰撞能量为 30%， AGC 目标为 $1e^6$，最大注入时间为 50 ms。窗口计算方式：建库采集到的 DDA 搜库结果，依据 m/z 将所有鉴定到的肽段数量进行排序，分成 36 组，每一组的 m/z 范围即为采集 DIA 数据的窗口宽度。

2.5 质谱数据分析

使用 Spectronaut X 软件对质谱数据进行处理和分析。导入每个样本 DIA 采集的 raw 文件进行搜库。高度可信蛋白标准为肽段 q value < 0.01，采用二级肽段所有碎片离子峰面积进行蛋白定量。

2.6 统计学分析

采用成组比较，两组数据之间的比较采用独立样本 t 检验。筛选差异蛋白标准为：两组之间变化倍数 FC≥1.5 或 FC≤0.67，P<0.05。

2.7 随机分组验证

为了确定鉴定到的差异蛋白由于随机产生的可能性，应用同样的筛选差异蛋白的标准：FC ≥ 1.5 & ≤ 0.67，P <0.01，进行随机分组验证。

2.8 差异蛋白的功能分析

利用悟空平台（https://www.omicsolution.org/）将总蛋白进行正交信号校正的偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）[7]。将筛选到的差异蛋白用 DAVID 数据库（https://david.ncifcrf.gov/）进行功能富集分析，采用 P < 0.05 的显著性阈值。

3 结果与讨论

3.1 动物模型构建及皮下肿瘤生长情况

三组实验组在皮下注射的 7-8 天后，肿瘤生长到可触及的状态时进行手术切除，手术后的第 7 天和第 30 天进行尿液收集，实验过程如图 2 所示。

肿瘤生长状况提示 10 只进行了皮下注射 MC38 细胞的小鼠都获得成功，长 7-8 天肿瘤大小（用平均直径表示）如表 1 所示，皮下瘤完全切除组进行手术切除后 90 天未见复发，认为手术切除成功。健康对照组未见任何异常。

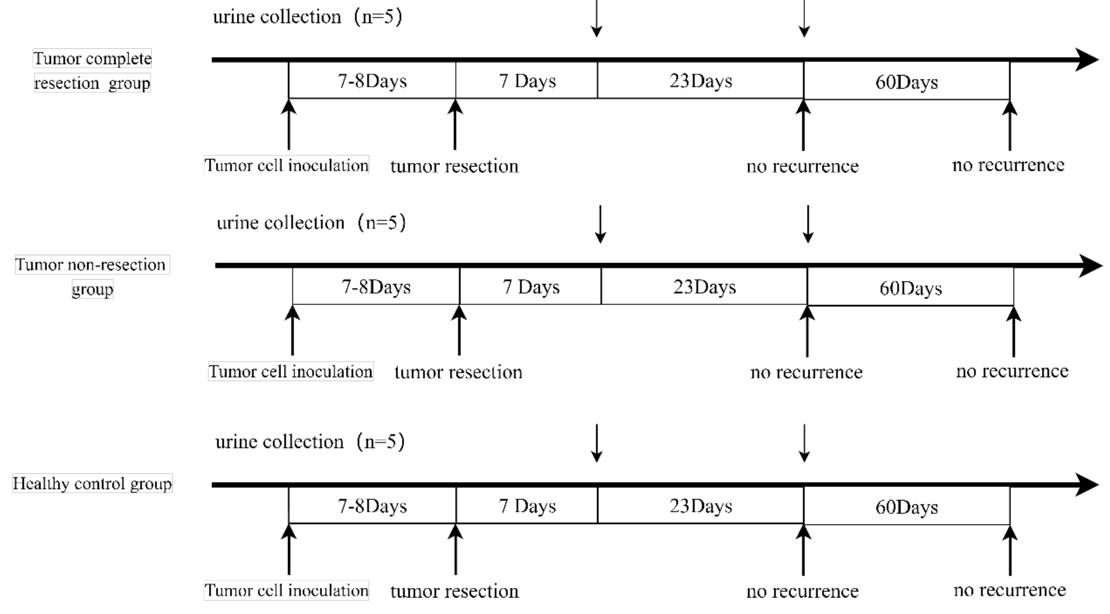


图 2 动物模型构建过程及收尿时间点

表 1 肿瘤大小（用平均直径表示）

完全切除组（n=5）					
No.	1	2	3	4	5
size（mm）	4.2	5.0	5.2	4.6	4.5
完全不切除组（n=5）					
No.	6	7	8	9	10
size（mm）	4.6	3.7	6.0	4.8	3.4
健康对照组（n=5）					
No.	11	12	13	14	15
size（mm）	-	-	-	-	-

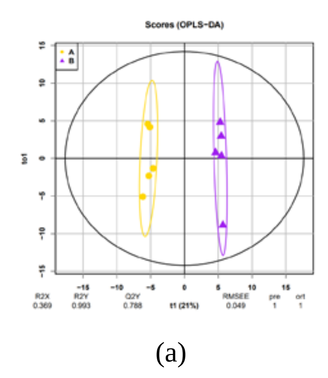
3.2 尿液蛋白质组变化分析

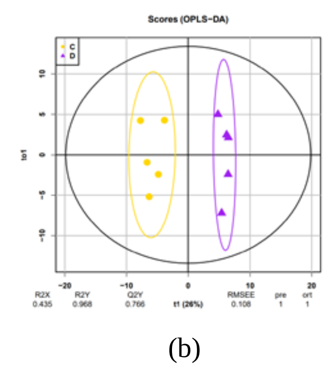
3.2.1 不同时间点尿液总蛋白的正交信号校正的偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）

经过 DIA 定量分析，三个实验组的两个时间点尿液蛋白质组的结果分析显示，所有样品共鉴定到了 405 种可信蛋白。

利用基于 OPLS-DA 分析，对术后 7 天完全不切除组完全切除组的两组样本（n=10）鉴定到的总的尿蛋白分析处理，结果如图 3（a）所示，两组能明显区分开。R^X、R^Y 和 Q^Y 的数值分别为 0.369、0.993 和 0.788，数据说明模型拟合准确度较好。对差异蛋白进行变量投影重要度（Variable Importance for the Projection, VIP）的计算，发现 20 个差异蛋白均满足 VIP 值 > 1.0 的标准，说明差异蛋白对模型构建前后两组样本分类判别对能力很强。

同样的，利用 OPLS-DA 分析，对术后 30 天完全不切除组完全切除组的两组样本（n=10）鉴定到的总的尿蛋白分析处理，结果如图 3（b）所示，两组能明显区分开。R^X、R^Y 和 Q^Y 的数值分别为 0.435、0.968 和 0.766，模型拟合准确度较好。对差异蛋白进行 VIP 计算，发现 33 个差异蛋白均满足 VIP 值 > 1.0 的标准，说明差异蛋白对模型构建前后两组样本分类判别对能力很强。


(a)


(b)

A：完全不切除组-D7　　B：完全切除组-D7　　C：完全不切除组-D30　　D：完全切除组-D30

图 3 两组样本不同时间总蛋白的 OPLS-DA 分析

3.2.2 D7 天完全切除与完全不切除组对比差异蛋白与生物学通路

手术后 7 天完全切除与完全不切除组对比筛选出 20 个差异蛋白（如表 2 所示），其中上调的差异蛋白 9 个，下调的差异蛋白 11 个，差异蛋白富集到 6 条生物学通路（如表 3 所示）。生物学过程包括昼夜节律、Notch 信号通路、白细胞间粘附、异嗜性细胞通过质膜粘附细胞分子等。有研究表明[8, 9]，昼夜节律与动物的伤口愈合和肿瘤生长都具有相关性，比如皮肤伤口愈合存在炎症，白细胞运输，组织重塑等过程，其中一些蛋白质参与了昼夜节律驱动的时间顺序协调机制。Notch 信号传导涉及多维皮下荷瘤行为的调节[10]。在一些实验中，Notch 信号传导可以直接用作癌基因或肿瘤抑制剂，并影响肿瘤细胞增殖，分化，细胞凋亡和基因组不稳定性[11]。机体通过对淋巴内皮细胞控制白细胞过渡的整联素配体 ICAM-1 和 VCAM 的表达调节，引起白细胞黏附作用增强产生抵御肿瘤的免疫反应[12]。

表 2　D7 天完全切除与完全不切除组的差异蛋白

Protein Accessions	Protein Descriptions	Fold change
Q62266	Cornifin-A	2.883407
P00687	Alpha-amylase 1	2.129584
Q91X17	Uromodulin	2.09201
O35657	Sialidase-1	2.001852
P0CG49	Polyubiquitin-B	1.968327
Q80X71	Transmembrane protein 106B	1.949486
Q60590	Alpha-1-acid glycoprotein 1	1.824588
P81117	Nucleobindin-2	1.727192
P18761	Carbonic anhydrase 6	1.540709
Q07797	Galectin-3-binding protein	0.668885
P06869	Urokinase-type plasminogen activator	0.668198
Q05793	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	0.665791
P29533	Vascular cell adhesion protein 1	0.662338
P05533	Lymphocyte antigen 6A-2/6E-1	0.661418
P0CW02	Lymphocyte antigen 6C1	0.660106

Q9ESD1	Prostasin	0.65866
P15947	Kallikrein-1	0.631505
Q9Z0J0	NPC intracellular cholesterol transporter 2	0.578208
O09051	Guanylate cyclase activator 2B	0.532387
Q9EP95	Resistin-like alpha	0.420915

表 3 D7 天完全切除与完全不切除组的差异蛋白相关生物学通路

Biological Process	PValue
circadian rhythm	1.33E-04
Notch signaling pathway	2.04E-04
ubiquitin homeostasis	0.003756
excretion	0.014015
leukocyte cell-cell adhesion	0.022336
heterophilic cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules	0.0478

3.2.3 D30 天完全切除与完全不切除对比差异蛋白与生物学通路

手术后 30 天完全切除与完全不切除组对比筛选出 33 个差异蛋白（如表 4 所示），完全切除组与完全不切除组相比，上调的差异蛋白 13 个，下调的差异蛋白 20 个，富集到 19 条生物学通路（如表 5 所示）。生物学过程包括细胞粘附、补体激活和替代途径、免疫系统的过程、葡萄糖代谢过程的正向调节、线粒体形态发生、血管生成等。其中，有文献表明细胞粘附、蛋白质定位到细胞表面的过程与肿瘤生长息息相关，特别是钙粘蛋白和整联素，因为这些蛋白可以充当配体活化的受体并通过物理环境变化激活相关信号传导[13]。在肿瘤生长过程中与免疫相关的通路经常发生改变，如肿瘤微环境中的补体激活可增强肿瘤生长并增加转移[14]。有证据表明钙依赖细胞粘附分子的变化与肿瘤有关，如钙粘蛋白 1（Cadherin-1，CDH1）钙粘蛋白的下调可以用于上皮癌的诊断和预后[15]。钙粘蛋白 13（Cadherin-13，CDH13）在肿瘤生长的血管中起调节作用，促进肿瘤新血管形成[15, 16]。此外，肿瘤细胞分泌高水平的促血管生成因子，这有助于产生异常的血管网络，因此肿瘤血管是癌症治疗管理的关键靶标[17]。

表 4 D30 天完全切除与完全不切除组的差异蛋白

Protein Accessions	Protein Descriptions	Fold change
Q8VED5	Keratin, type II cytoskeletal 79	3.026224
P00687	Alpha-amylase 1	2.778291
Q922U2	Keratin, type II cytoskeletal 5	2.73239
Q61781	Keratin, type I cytoskeletal 14	2.68467
P11591	Major urinary protein 5	2.292109
Q6NXH9	Keratin, type II cytoskeletal 73	1.996678
P03953	Complement factor D	1.783884
O55186	CD59A glycoprotein	1.670896
Q61581	Insulin-like growth factor-binding protein 7	1.597907
P09803	Cadherin-1	1.541891
Q9JJS0	Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2	1.534623

P11589	Major urinary protein 2	1.522737
P01132	Pro-epidermal growth factor	1.515764
Q07456	Protein AMBP	0.651965
P47878	Insulin-like growth factor-binding protein 3	0.628489
P04186	Complement factor B	0.626626
Q9WTR5	Cadherin-13	0.617213
P11276	Fibronectin	0.594281
Q61129	Complement factor I	0.578513
Q921W8	Secreted and transmembrane protein 1A	0.574514
O88968	Transcobalamin-2	0.537758
Q91X72	Hemopexin	0.472864
P0CW02	Lymphocyte antigen 6C1	0.465717
Q8K4G1	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4	0.453987
O09051	Guanylate cyclase activator 2B	0.441702
P25119	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	0.431061
Q9EP95	Resistin-like alpha	0.388686
Q05793	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	0.378189
P29533	Vascular cell adhesion protein 1	0.351521
O08997	Copper transport protein ATOX1	0.318311
Q91VW3	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	0.296519
Q4KML4	Costars family protein ABRACL	0.253859
Q61646	Haptoglobin	0.213844

表 5　D30 天完全切除与完全不切除组的差异蛋白相关生物学通路

Biological Process	PValue
cell adhesion	0.005498
regulation of protein localization to cell surface	0.013362
complement activation, alternative pathway	0.014836
immune system process	0.018926
cell activation	0.02071
heat generation	0.022174
positive regulation of lipid metabolic process	0.022174
cellular response to lipid	0.022174
negative regulation of lipid biosynthetic process	0.023635
aging	0.027313
calcium-dependent cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules	0.028006
negative regulation of lipid storage	0.028006
positive regulation of glucose metabolic process	0.03091
energy reserve metabolic process	0.032359
negative regulation of insulin secretion involved in cellular response to glucose stimulus	0.032359
negative regulation of gluconeogenesis	0.03525
locomotor rhythm	0.038133
mitochondrion morphogenesis	0.046732
angiogenesis	0.049176

3.2.4 D30 天完全切除与健康对照组对比差异蛋白

手术后 30 天完全切除与健康对照组对比筛选出 8 个差异蛋白（如表 6 所示），其中上调的差异蛋白 3 个，下调的差异蛋白 5 个，未富集到生物学通路。富集不到生物学通路。将手术后 30 天完全切除与完全不切除组的 10 只小鼠尿液蛋白质组数据进行随机分组，结果显示，在 125 种随机分组结果中平均筛选出约 3.77 个差异蛋白，说明差异蛋白的假阳性率达到 47.125%，这提示我们手术进行 30 天后，肿瘤完全切除小鼠同健康未接种过肿瘤的小鼠的尿液蛋白质水平差异不明显。

表 6　D30 天完全切除与健康对照组的差异蛋白

Protein Accessions	Protein Descriptions	Fold change
Q922U2	Keratin, type II cytoskeletal 5	2.102056
P60710	Actin, cytoplasmic 1	1.694629
O55186	CD59A glycoprotein	1.501774
P11276	Fibronectin	0.61668
P0CW02	Lymphocyte antigen 6C1	0.609322
P06869	Urokinase-type plasminogen activator	0.575882
Q05793	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	0.52626
Q91WR8	Glutathione peroxidase 6	0.479504

3 结论

实验表明，尿液蛋白质组学有潜力区分实体肿瘤是否被切除。

参考文献

1. Gao, Y., Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery? Sci China Life Sci, 2013. 56(12): p. 1145-6.

2. Wu, J., Z. Guo, and Y. Gao, Dynamic changes of urine proteome in a Walker 256 tumor-bearing rat model. Cancer Med, 2017. 6(11): p. 2713-2722.

3. Wei, J., et al., Early urine proteome changes in the Walker-256 tail-vein injection rat model. Sci Rep, 2019. 9(1): p. 13804.

4. Wang, T., et al., Early urine proteome changes in an implanted bone cancer rat model. Bone Rep, 2020. 12: p. 100238.

5. Zhang, Y., Y. Gao, and Y. Gao, Early changes in the urine proteome in a rat liver tumour model. PeerJ, 2020. 8: p. e8462.

6. Wei, J. and Y. Gao, Early disease biomarkers can be found using animal models urine proteomics. Expert Rev Proteomics, 2021. 18(5): p. 363-378.

7. Yang, Y., et al., StatsPro: Systematic integration and evaluation of statistical approaches for detecting differential expression in label-free quantitative proteomics. J Proteomics, 2022. 250: p. 104386.

8. Cable, E.J., K.G. Onishi, and B.J. Prendergast, Circadian rhythms accelerate wound healing in female Siberian hamsters. Physiol Behav, 2017. 171: p. 165-174.

9. Sherratt, M.J., et al., Circadian rhythms in skin and other elastic tissues. Matrix Biol, 2019. 84: p. 97-110.

10. Hu, X.B., et al., Blockade of Notch signaling in tumor-bearing mice may lead to tumor regression, progression, or metastasis, depending on tumor cell types. Neoplasia, 2009. 11(1): p. 32-8.

11. Bernardo, M., et al., An experimental model of anti-PD-1 resistance exhibits activation of TGFss and Notch pathways and is sensitive to local mRNA immunotherapy. Oncoimmunology, 2021. 10(1): p. 1881268.

12. Rodriguez-Ruiz, M.E., et al., Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule Are Induced by Ionizing Radiation on Lymphatic Endothelium. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2017. 97(2): p. 389-400.

13. Janiszewska, M., M.C. Primi, and T. Izard, Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. J Biol Chem, 2020. 295(8): p. 2495-2505.

14. Afshar-Kharghan, V., The role of the complement system in cancer. J Clin Invest, 2017. 127(3): p. 780-789.

15. van Roy, F., Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. Nat Rev Cancer, 2014. 14(2): p. 121-34.

16. Andreeva, A.V. and M.A. Kutuzov, Cadherin 13 in cancer. Genes Chromosomes Cancer, 2010. 49(9): p. 775-90.

17. Viallard, C. and B. Larrivee, Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. Angiogenesis, 2017. 20(4): p. 409-426.